

201114010B

## 厚生労働科学研究費補助金

### 医療技術実用化総合研究事業

光超音波マンモグラフィにおける乳がん診断基準の整備と  
高機能化のための広帯域 PAT プロブの開発に関する研究

平成21年度～平成23年度 総合研究報告書

研究代表者 戸井 雅和

平成24(2012)年 5月

# 厚生労働科学研究費補助金

## 医療技術実用化総合研究事業

光超音波マンモグラフィにおける乳がん診断基準の整備と  
高機能化のための広帯域 PAT プローブの開発に関する研究

平成21年度～平成23年度 総合研究報告書

### 研究代表者

戸井 雅和

京都大学大学院医学研究科外科学講座乳腺外科学 教授

### 研究分担者

椎名 毅

京都大学大学院医学研究科人間健康科学系専攻・生体医工学 教授

富樫 かおり

京都大学大学院医学研究科放射線医学講座(画像診断学・核医学) 教授

佐藤 亨

京都大学情報学研究所・電磁波計測理論 教授

浅尾 恭史

キヤノン(株)総合 R&D 本部・医用イメージング第二開発推進プロジェクト  
主幹研究員

金尾 昌太郎

京都大学医学部附属病院放射線部 助教

片岡 正子

京都大学医学部附属病院放射線診断科 特定病院助教

平成23(2011)年 5月

## 目 次

I. 総合研究報告		
光超音波マンモグラフィにおける乳がん診断基準の整備と 高機能化のための広帯域 PAT プローブの開発に関する研究 戸井雅和	-----	1
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	29
III. 研究成果の刊行物・別刷	-----	巻末

厚生労働科学研究費補助金(医療技術実用化総合研究事業)

総合研究報告書

光超音波マンモグラフィにおける乳がん診断基準の整備と高機能化のための広帯域 PAT プローブの開発に関する研究

研究代表者 戸井 雅和 京都大学大学院医学研究科 外科学講座 乳腺外科学教授

#### 研究要旨

平成21年度から平成23年度までの本研究事業の進捗は次の通りである。①光超音波マンモグラフィ(PAM)の1次試作機を用いた探索的臨床研究を完了し、他モダリティならびに病理組織と PAM 像を対比検討させる手法を確立した。②広帯域 PAT プローブの試作および動物実験を通して、課題の抽出と対策法の提示を行った。①は PAM 試作機による臨床研究を推進するとともに、手術前に撮像した PAM 像(血管集簇度ならびに酸素飽和度)と、手術後の病理標本から得られる免疫染色結果とを対比させるための手法を確立した。②は広帯域 PAT プローブの2つの候補技術(Focus transducerを用いた顕微鏡方式と Fabry-Perot 型干渉計を用いた光検出方式)について、試作及び改良検討を行った。これを用いて基礎データの取得、ならびに動物実験を行った。また FP 方式において世界で初めて高速カメラによる超音波像のイメージングを実現した。

本テーマは以下の研究グループで推進しているが、研究代表者の戸井のもとに、互いに連携して広帯域 PAT プローブの開発を行っているため、報告書に関しても総括研究報告書と分担研究報告書に分けることなく、すべてを総合研究報告書としてとりまとめて作成した。

戸井 雅和	京大院医学研究科乳腺外科学教授
椎名 毅	京大院医学研究科人間健康科学系専攻・生体医工学教授
富樫 かおり	京大院医学研究科・画像診断学・核医学教授
佐藤 亨	京大院情報学研究科・電磁波計測理論教授
金尾 昌太郎	京都大学医学部附属病院放射線部 助教
片岡 正子	京都大学医学部附属病院放射線診断科 特定病院助教
浅尾 恭史	キャノン(株)・総合R&D本部・医用イメージング第二開発推進プロジェクト主幹研究員

#### A. 研究目的

本研究は、文部科学省「先端融合イノベーション事業」(京都大学-キャノン協働研究プロジェクト:CKプロジェクト)の1つとして、取り組んでいる「光超音波マンモグラフィ」の臨床現場への適用を迅速かつ効率的に進める上で必要な、広帯域PATプローブの開発と活用を進めるものである。

乳がん罹患者は全世界で 110 万人に達し、年々増加傾向にある。日本でも女性のがん罹患の1位は乳がんであるが、日本人の乳がんの好発年齢は 40 歳代であり、欧米よりも若いという特徴がある。乳がん検診ではマンモグラフィが普及してきたが、乳腺密度が高い 40 歳代では精度が低下し、また、被曝の問題から 30

歳代には適さないと言われている。

「光超音波マンモグラフィ」(以下 PAM)は、被曝の心配がなく、また乳腺密度の高い若年層の乳がん診断に適する超音波像との同時計測も可能なため、高齢者だけでなく30～40歳代の若年層の乳がん診断に関して飛躍的な精度向上が期待できる。また、形態と機能イメージングの統合を可能とする装置を目指している。これにより例えば腫瘍の新生血管の描出によるがんの超早期診断や、良悪性の鑑別診断、治療効果の正確な評価が可能となることで、適切な治療法選択につながり、患者のQOLの向上や医療費削減などの経済的効果も期待できる。また、簡便さに加え将来の小型化技術の開発により近くの診療所で受診可能になれば、乳がんの早期診断率も飛躍的に向上し、死亡率低下につながる事が予想される。本手法は、造影剤などを必要としないものであるが、さらに将来は分子プローブの開発により、腫瘍特異的に高コントラストなイメージを得られる可能性があり、更なる高精度な診断が期待できる。

PAMは、これまでの基礎研究(J. Biomed. Opt.9. 1129 (2004)等)で、近赤外光の吸収分布から、がん腫瘍の微細血管増殖の状態や組織性状の違いを捉えることで、早期検出に効果的であるとの見通しを得ている。一方で、各病態と光音響像との詳細な関係は解明されていない。このため、PAMの臨床応用を迅速かつ適切に行うために、各病態と光音響像との関係を明らかにして診断基準を整備するとともに、新規診断情報を提供しうる画期的な医療機器としての有効性を明らかにすることを本研究の目的とする。

## B. 研究方法

### B-1. 概要

PAM装置については、京都大学-キャンノン協働研究プロジェクトにおいて、これまで培ってきた高次超音波画像技術と、キャンノンの光イメージング技術を結集して、世界初の全乳房撮影可能なプロトタイプ機を開発し5

年以内の医療機器の薬事申請を目指している。当初からの計画通り、乳がん患者を対象とした臨床研究を平成22年度に開始し、平成23年度末にPAM試作1号機を用いた探索的臨床研究を完了させた。また、この開発を加速するため、先端医療開発特区「イメージングが拓く革新的医療機器創出特区」(研究代表:平岡真寛)にて早期実用化を図るべく開発を推進した。さらに、平成23年度に完成した経済産業省「先端医療機器開発・臨床研究センター」を拠点とし、PAM試作2号機による臨床研究を進める準備を整えた。

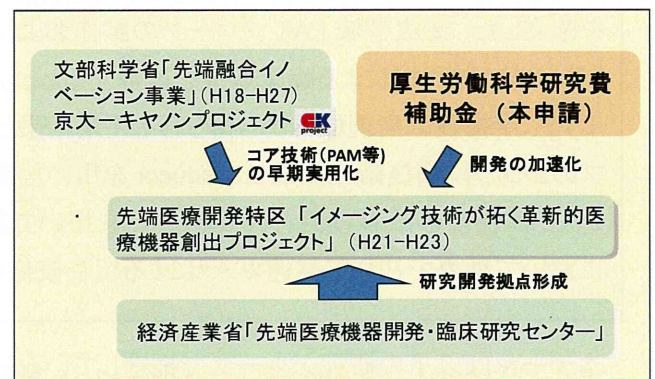


図1 研究スキーム

本研究テーマでは、上記PAMの実用化を更に加速することを目指して、PAMで得られた画像の臨床的価値を明らかにするための診断基準の整備を行う。その手段として、血管像を詳細に観測するための高解像PATプローブを開発する。

すなわちPAMではがん部位で血管が集簇している領域が高コントラストとして描出されることを利用して、全乳房範囲でのがんの分布を撮影するため、解像度よりもむしろ十分な診断深度の確保を優先させている。このため現在開発中のPAM装置単独では空間分解能が不足しており微細血管の詳細な描出には適さない。

そこで本研究では、新生血管など100 $\mu$ m以下の微細血管の構造を詳細に捉え、さらにマルチスペクトルの光超音波像を計測できる、広帯域PAT(Photo

Acoustic Tomography)プローブを開発する。このプローブは高解像な像を得るために、PAM 装置よりも高周波帯(例えば数十 MHz)の範囲までの超音波が受信可能なものである。この場合、超音波や光の減衰によって体表から深部を見ることは困難であるが、逆に体表近くは詳細に観察することが可能となる。これにより、浅在性の腫瘍に対しては体表から、あるいは術中に患部近くに当てて計測することを想定すれば、高解像な血管イメージングを行うことが可能となる。

この広帯域 PAT プローブにより、詳細な病態とPAM で得られる光超音波像との関係を明らかにすることを計画し開始した。これにより PAM の診断基準の構築と、高機能化に向けて探索的な臨床研究を進め、その早期実用化を図ることを狙いとした。

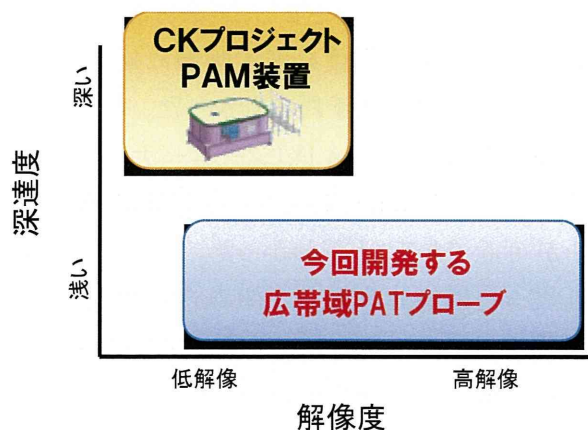


図2 広帯域 PAT プローブの狙い

また本 PAT プローブは詳細な血管像を描出できることから、化学療法等による血管収縮の様子を観測できる。このため、効果的ながん治療に役立つ装置としての臨床応用が期待できる。更に乳腺に限らず、他の診療科に対しても応用できるものと期待できる。

## B-2. 研究計画

本研究は下図のロードマップに示すように、

- (1)広帯域PATプローブの開発、
- (2)診断基準の整備、
- (3)マルチスペクトルによる高機能化

の3つの課題について取り組む計画とした。(1)は、生体医工学を専門とする椎名と、装置開発を担当とするキヤンの浅尾が主として担当する。(2)は、乳腺外科を専門とする戸井による臨床評価を中心に、富樫が画像診断学の立場からPAMとMRIの対比などマルチモダリティの画像解析を行う。(3)は椎名、浅尾に加え、電磁波計測が専門の佐藤が広帯域レーダー技術の応用の視点から加わる。実際には、相互に関連しあうので、研究代表者である戸井の統括のもとに、密接に協力して推進する。

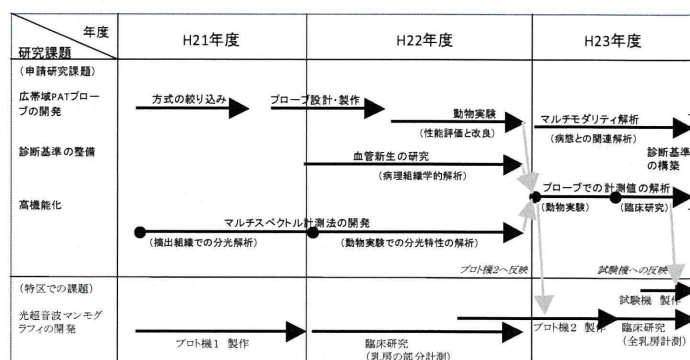


図3 研究計画のロードマップ

平成21年度は上記ロードマップに準拠して、広帯域 PAT プローブの候補技術の絞り込みと、マルチスペクトル計測法のための開発環境の整備を行った。平成22年度は、各病態の微細血管構造と PAM 像との相関を明らかにして診断基準を構築し、PAM 装置実用化を加速するための研究を推進した。平成23年度は微細血管を描出可能な装置を完成させ、動物実験を実施した。またこれを実用に適用可能な装置の試作に取り組んだ。並行して新生血管の発生メカニズム解明につながる研究に取り組んだ。

## B-3. 研究の手段

本年度は各病態の微細血管構造と PAM 像との相関を明らかにするために、以下の二つの研究を推進した。

1. 新生血管の病理組織学的解析
2. 広帯域 PAT プローブの開発

一つ目はがんの成長にともなって形成される新生血

管の病理組織学的解析であり、摘出がん病理標本での血管像とPAM像とを対比する研究である。これは現在のPAM臨床研究のエビデンス構築を狙いとしている。

まず、PAMが血管内のヘモグロビン吸収をイメージングする装置であることから、病理標本を用いてCD31染色を用いた血管密度の定量化を試みた。従来の血管密度の定量化は手作業による血管数のカウントに依っていた。そうした検討手法では、局所的な血管の生成の様子は定量化可能であるが、PAM画像との対比を行うために全撮像範囲を網羅的に解析することは現実的には不可能である。そこで、自動で処理する手法を検討した。

次いで、PAMは血中ヘモグロビンの酸素飽和度を測定可能であるため、このエビデンス構築のために、特殊染色を用いることによって低酸素状態に曝されていた組織を描出させる手法を構築した。これにより、PAMによって得られる酸素飽和度画像と病理染色とを対比させる研究を推進した。また組織の低酸素状態と、血管密度ならびに血管の成熟度を同時に解析し、新生血管の生成メカニズム解明に迫りうる手法の確立を狙いとして研究を推進した。

二つ目は冒頭に述べた広帯域PATプローブの新規開発である。平成21年度に二つの候補技術を抽出し、平成22年度に試作を進め、平成23年度はさらなる改善検討を行い、ファントム評価および動物実験を行った。こうした実験により課題を抽出し実用化に向けた構想設計を実施した。

以下、これら研究の手段について詳細に述べる。

#### [新生血管の病理組織学的解析]

PAMでは、組織内の吸収係数とヘモグロビンの酸素飽和度を画像化することが可能である。これらの画像はがんによって生成される新生血管と強い相関がある。この新生血管を病理組織学的に解析するための手段を検討した。

PAMの臨床研究プロトコールに基づいて、手術する直前の患者を対象として被験者を選択し、PAM画像を取得した。その後、通常の診療方針に基づき手術を行い、摘出組織をパラフィンブロックとした。得られた病理組織は、通常診療に必要な染色及び診断が行われた後、本研究に必要な特殊染色を実施した。

PAMによって得られる吸収係数は主としてヘモグロビンの濃度を示すものであるため、がんの成長に伴って生成される新生血管の量と相関する。そこで、血管内皮細胞をCD31によって染色させ、画像処理によって定量化を行った。この結果とPAMの吸収係数を表す画像とを対比させた。

一方PAMは、複数のレーザー波長によって得られたPAM像から吸収係数の波長依存性を求め、酸素飽和度画像を計算し、表示させることが可能である。これに関し、従来酸素飽和度を表す画像に対しては病理染色によって傍証する手段がなかった。そこで、文献調査を実施した結果、CA IX(シーエーナイン)という抗体を採用することによって組織の低酸素状態を見積もることが可能であることがわかった。この抗体と、従来構築してきた画像処理技術を組み合わせ、低酸素領域を定量化することによってPAMの酸素飽和度画像の傍証とすることができるかどうかを検討した。

これらの検討と並行し、SMAによる染色を行った。これにより、血管を正常に働かせるための機能を付与するペリサイトの有無を見積もることが可能となり、その結果血管の成熟度を見積もることができる。つまり、これらCD31, SMA, CA IXの結果を同時に考察することによって、酸素飽和度の多寡と、血管の機能および量を見積もることが可能となる。

つまり本研究によってPAM像のエビデンスが構築されるだけでなく、癌による新生血管発生のメカニズムの理解につながることが期待される。

#### [広帯域PATプローブの新規開発]

上記のとおり病理解析により血管像を求め定量化する一方で、微細血管を in vivo でイメージングする手法に関して開発を進めている。これを実現する手段が広帯域 PAT プロブである。これにより PAM 測定結果と微細血管構造との対応関係が非侵襲で測定可能となるため、診断基準の構築に極めて有効な手段となる。

平成21年度に2つの候補技術である光音響顕微鏡方式(Photo Acoustic Microscopy: 以下、PA-MS 方式と称する)と、Fabry-Perot 干渉系を超音波センサーとして用いた方式(以下、FP 方式と称する)を選定した。その後試作や評価を通して実用化に向けた検討を行ってきた。

ここでまずこれらの原理を簡単に述べる。

PA-MS 方式は Washington 大学を中心に研究が進められている方式であり、光音響波を受信する際にフォーカストラנסデューサを用いることが特徴である。被験体の広い範囲に光が照射された場合、様々な位置から光音響波が生じるが、その一部分のみ、すなわちフォーカストラנסデューサの焦点となる微小な範囲のみ信号を受信するように設定する。これにより微小な領域での光音響信号を得ることが可能となる。また時間軸方向で強度変化の解析を行うことによって、奥行き(Z)方向に存在する吸収体の分布を知ることができる。こうした光音響波受信を被験体の水平面内(XY 平面内)において走査しながら測定し、データ保存し、全体を統合して画像化することによって、高解像な三次元光音響像を得る方式である。

一方の FP 方式は図4に表される原理によって超音波受信を行う。

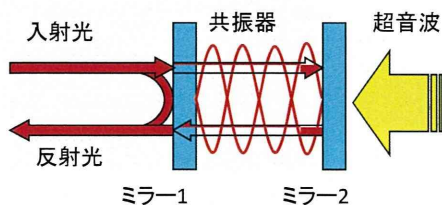


図4 FP方式の原理図

図4に示すとおり、2枚の平行なミラーを構成することによって光干渉が生じる共振器が得られる。共振波長はミラー間の距離と用いる波長によって決定される。図5はシミュレーションによって求めたFP方式の特性を示す図である。この図のように干渉条件を満たす膜厚において急峻に反射率が変化する。

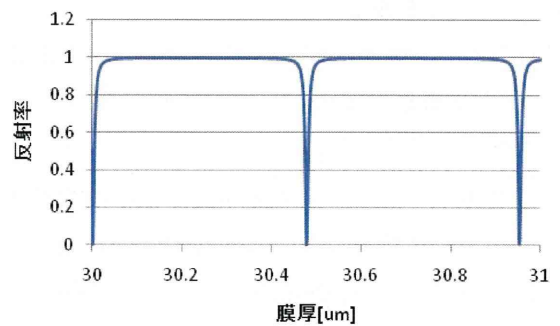


図5 FP方式の特性を示す図

ここで、共振器にポリレンなどの所定の弾性を有する高分子樹脂膜を用いれば、外部からの圧力によって変形が生じる結果、ミラー間の距離を変化させることが可能となる。これを利用すれば、音波の到達による圧力変化に伴って膜厚が変化するため、反射率の変化として検知することが可能となる。例えば、無圧の条件において図6における反射率50%の条件に膜厚を設定しておけば、音波受信によるわずかな膜厚変化を反射率の変化として観測することが可能となる。

反射率を測定する光のスポット径はレンズによって自由に変化させることが可能である。このため、光を絞ることによって微小な領域の圧力変化を検知することが可能となる。このため、簡便な構成で二次元アレイ型探触子と同等の素子を得ることが可能となる。これにより、得られた音波を画像再構成することによって、高精細な三次元光音響画像を得ることが可能となる。また一般に2次元アレイ型探触子では素子面積を小さくすれば感度が低下するが、本FP素子では測定する光



の強度を増加させることで受信光強度を確保することができるため、超高精細な素子であっても原理的に感度を低下させることがないことが特徴である。

本年度は前年度までの試作を更に発展させるとともに、実用化に向けた検討を推進した。光学系など、用いる部品は可能なかぎり市販の汎用品を用い、必要に応じて特注の加工を行った。

#### (倫理面への配慮)

試作した装置を用いてヌードマウスによる動物実験を行った。実験動物の使用は、本研究における課題抽出に必要な最小限の量とした。

ヒトを対象とした PAM 臨床研究や病理組織の解析においては、京都大学医の倫理委員会ならびにキヤノン株式会社生命倫理委員会に諮り、倫理的に問題がないことを十分確認した上で検討を行った。

### C. 研究結果

#### C-1. 新生血管の病理組織学的解析

##### (血管密度の解析法)

PAM によって得られる吸収係数分布の画像と血管密度との対比を行うために、病理スライドを CD31 にて免疫染色を行った。バーチャルスライド撮像装置を用いて画像として取り込み、染色部位の自動カウントと、PAM 像との対比を行った。

画像処理ソフトとして Image Pro Plus (以下、IPP と称する)を用い、マクロプログラムによって自動的に染色部位を抽出し定量化を行った。血管の数に関して、病理診断医の指導に基づいて手作業でカウントした結果と、IPP によって自動でカウントした結果が正しく対応付けられているかを検証するため、以下の相関を求めた。

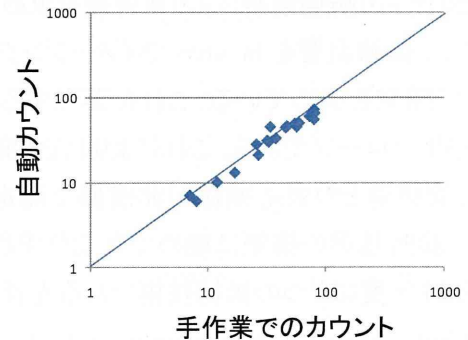


図5 カウント手法の比較

図5のグラフより求められる決定係数  $R^2$  は 0.925 であり高い相関を示していた。これによりヒト乳がん組織の免疫染色においても本研究による画像処理によって適切に評価できることが確認された。これにより、画像読取-解析-解析結果の保存を、複数の画像について連続して自動で処理することを可能とした。

#### (PAM 結果への適用)

図6は PAM で得られた画像の一例であり、造影 MRI 画像との対比を行った図である。この症例は、浸潤性乳管癌の患者であり、術前薬物療法が奏功し腫瘍が小さくなる過程において、元々1つであった腫瘍が2つ以上の腫瘍塊に分かれたことが、MRI によって確認されていた症例である。その2ヶ所に分離した腫瘍の場所を図6の MRI 像において“a”と“b”とで表している。

その被験者に対して PAM 撮影を行ったところ、PAM においても MRI と同様のスライス面において2ヶ所に強信号を得ることができた。

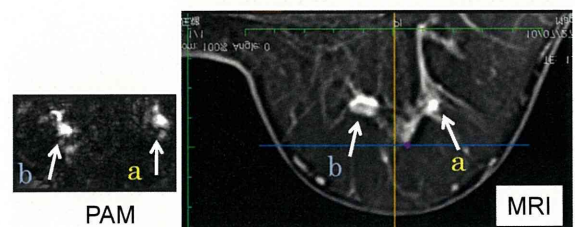


図6 PAM と MRI との対比

この症例について、病理解析によって画像と血管集簇度との対比を行った。図7は病理解析の一連のスキームと、その結果を表したものである。

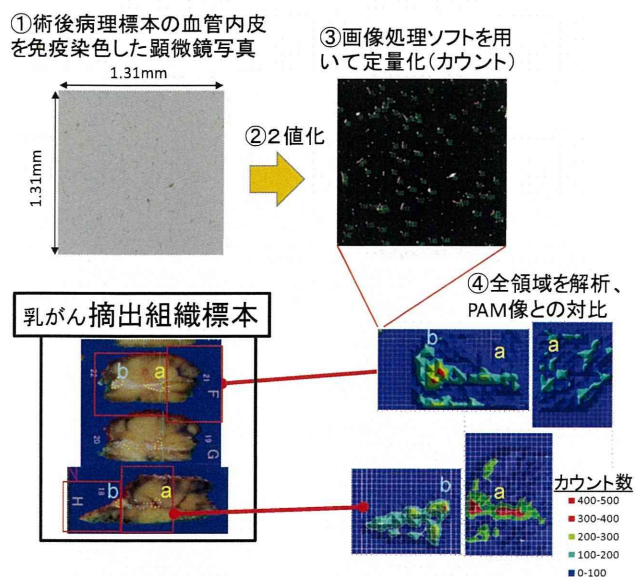


図7 病理解析の具体例

図7の①は CD31にて免疫染色された組織のバーチャルスライド画像の一部である。これについて適切な条件で2値化してカウントしたものが図7③に示す結果の写真である。このように血管部位が抽出され結果が記録される。

この①③で処理した領域は1.31mm角の正方形である。病理スライド全体を解析するために、順次データを読み取って自動解析を行った。通常スライド全体では概ね 500～600 画像を処理することになる。こうして処理されたそれぞれの画像における血管のカウント数を、その数に応じて色分けしてマッピングしたものが図7④に示されたグラフである。ここでは赤色がカウント数の多い箇所、青色が少ない箇所とするように色付けを行った。

このマッピングによると、摘出病理組織の、向かって左と右とにそれぞれ血管集簇の多い箇所が観測された。またこの集簇の多い箇所は通常病理診断において、浸潤性乳管癌と診断された領域と一致していた。

これら血管集簇位置や病理診断結果での腫瘍位置にも”a””b”という符号を図中に記載した。これを先の図6と対比してみると、こうした2ヶ所に分かれている様子が画像診断結果とも対応していた。

このように自動カウント法で実施した定量化が多くの症例で成功していたが、詳細に観察してみると、CD31染色では、必ずしも血管内皮細胞のみを染色するわけではなく、血管以外の異なる場所に非特異的な染色が生じる場合があった。この場合、画像のみで判定し自動処理させるだけでは誤った結果を導いてしまうことがあった。このため、染色像をつぶさにチェックし、非特異的な染色の有無を確認しながら定量化検討を進めている。

同時に、非特異的な染色が生じないような染色条件の再検討も進めている。これはまだ完全な結果が得られておらず、今後の課題として残されている。

#### (低酸素領域の解析)

次いで、PAMによって得られる酸素飽和度分布の画像と組織の低酸素領域との対比を行うために、本年度は新たに CA IX による染色を実施した。また、がんによる新生血管と正常血管の間には血管としての機能の成熟度に違いが存在し、そこには血管周囲にペリサイトが存在するか否かが重要であるという仮説がある。そこで新たに SMA 染色を実施した。

また、更に本研究では、①血管密度、②血管分化度(成熟度)、③血流動態、④組織の低酸素状態が相関し、がん周囲の血液のヘモグロビン酸素飽和度が決定されるという仮説を立てた。そこで、まずは①を解析するための CD31 染色に引き続き、②を解析するための SMA 染色(ペリサイトの有無)、ならびに④を解析するための CA IX 染色を実施した。

図8はPAMによって得られる酸素飽和度画像の一例である。ここでは皮下にある表在血管部位の画像を示しており、画像の明るさが吸収係数の大小を表し、画

像の色相が酸素飽和度の大小(赤→酸素飽和度大、青→酸素飽和度小)を表している。

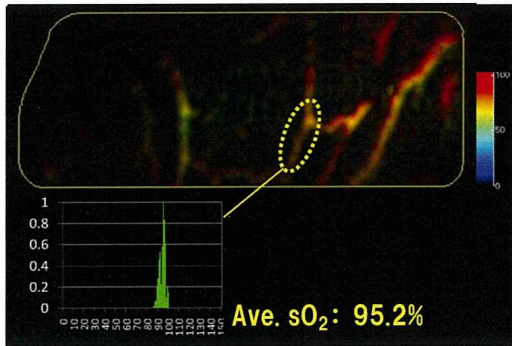


図8 PAM によって得られる酸素飽和度像の一例

こうして得られる PAM 画像と病理結果とを対比させるために、血管集簇、酸素飽和度および血管の成熟度を、同一の領域内で評価することを狙いとし、研究をスタートさせた。

しかしながらこの場合、単一のスライドのみを用いて複数の抗体を染色させることは、組織へのダメージが生じるなどの理由で困難であることが予想された。中でも、2種の抗体までであれば Double staining 手法により実現可能性はあったが、今回検討しようとする3種の抗体を同時に観測するため非常に困難であり、別の手段を検討する必要が生じた。

そこで、パラフィンブロックを4  $\mu$ m ずつ連続的にスライスした病理スライドを用いてそれぞれの抗体による染色を行い、染色されている領域を画像処理によって抽出し画像上で重畳させる手法を採用した。結果の一例を図9に示す。

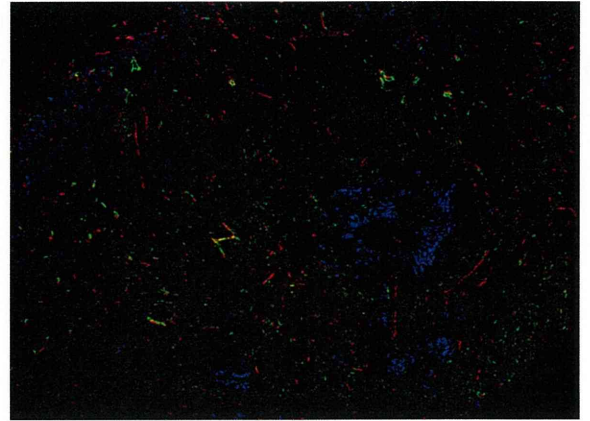


図9 結果の一例

ここで、赤が CD31 染色部位、緑が SMA 染色部位、青が CA IX による染色部位である。この図から、CD31 染色が少ない領域に CA IX 染色が多い様子が観測される。これは血管量が少ない領域では酸素供給が不十分であり、低酸素状態になると考えると妥当な結果である。

さらに詳細に観察すると、CD31 と SMA が二色同時に染色されている領域では CA IX 染色が少ない状態が観察されている。これは血管としての機能が働いている領域では酸素供給が円滑であるため、低酸素領域が少ないことを示唆している。今後は PAM によって得られる酸素飽和度と、本研究の病理血管との相関を解析する計画である。

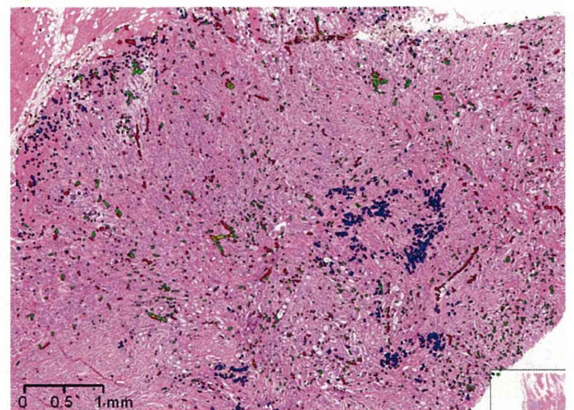


図10 HE 染色画像に重畳

さらに、図10は図9の結果を HE 染色画像に重畳させたものである。こうした病理像との対比データを蓄積しながら、がん細胞の悪性度などと血管の質・量および組織の低酸素状態との相関を解析することが、今後の新生血管の発生メカニズムの解明につながるものと期待される。

### C-2. 広帯域 PAT プロブの開発

先に述べたとおり、本検討では PA-MS 方式と FP 方式とを同時並行で開発を行った。それぞれについて結果を示す。

(PA-MS 方式)

#### [1] 装置の試作

PS-MS 方式について試作を行った。図11が PA-MS 方式の構成図である。

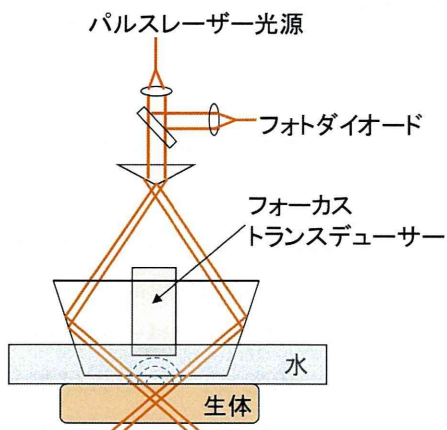


図11 PA-MS 方式の構成図

Q-スイッチ YAG レーザー光の2倍波(532nm)を照射して、発生した光音響信号を50MHz のフォーカス トランスデューサーにて受信する構成とした。作製した試作品を図12に示す。

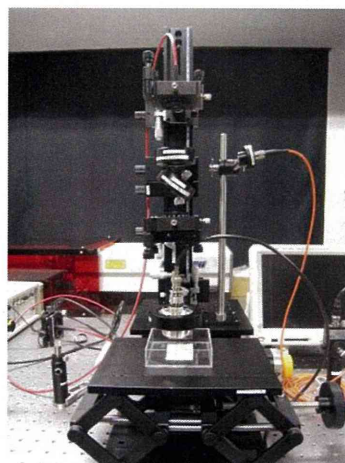


図12 PA-MS 方式の試作機

この装置を用いて、分解能評価を行った。ここでは解像度テスト用ターゲットである USAF 1951 Chart (図13)を用いた。

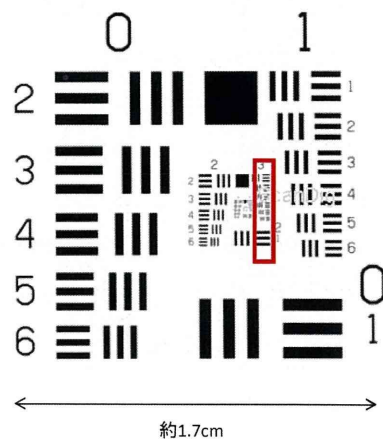


図13 解像度テスト用チャート

ここで、図13において赤色の四角で囲った領域 (Group3 element 1-6) について評価を行った。この測定は図14に示すように2つの条件で実験を行った。まず、ターゲットに直接光を当てて解像度を測定した(図14(a))。次いで、寒天で固めた厚さ3mmの光拡散体をターゲットに覆って測定した(図14(b))。図14(b)は生体を模した条件を想定しており、光拡散体に隠されているために目視ではチャートを視認することができない。

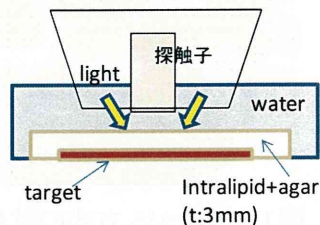
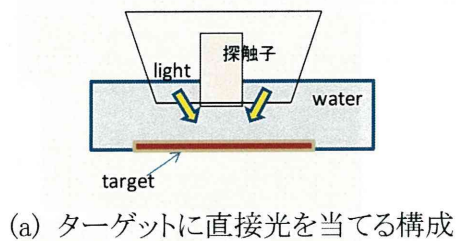


図14 解像度チャートの実験条件

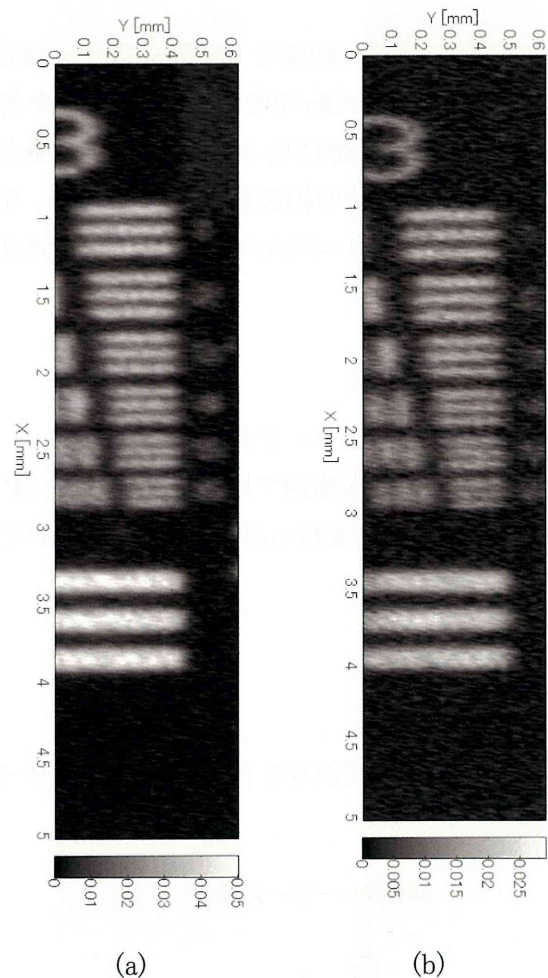


図15 測定結果

本実験で用いたサンプリングレートは250MHz、X方向の走査として0.01mmピッチで501ステップ、Y方向の走査として0.02mmピッチで31ステップ、の操作を行った。

得られた画像を図15(a), (b)に示す。(a)と(b)の測定条件はそれぞれ図14(a), (b)に示した内容と対応している。この結果を見ると、(a)(b)ともに概ね35マイクロンのラインが分離された画像が得られている。これにより、解像度は35マイクロン以上であるといえることができる。

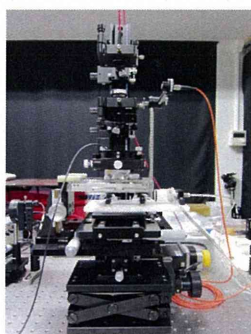
なお、図15の(a)(b)間で比較したとき、画像上からは両者の解像度に有意な差が観測されなかった。それに対し、信号強度はスケールバーの数値を見ると、(b)の方が半分程度に落ちている。これは拡散体の影響によりターゲットに到達する光密度が低下したためと考えられる。実際の生体では、光吸収が存在するためさらに強度は低下すると考えられるが、生体を模した拡散体の中においても有意に解像度が低下しないことが示された。

そこで、引き続き生きた状態でのマウスの微細血管を測定するために装置の改良を行った。

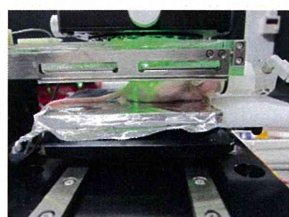
図16に示すように、生体と探触子との音響マッチングをとるため、生体と探触子の間に水槽を配置し、水

槽の底面は超音波の反射を抑えるためにポリエチレンフィルムを用いた。水槽の底面により生体を軽く押し当てて保定した。水温はマウスの苦痛にならないよう体温(約 37°C)になるように制御した。

測定中は吸入麻酔を行い、麻酔薬にはエスカインを用いた。一連の PA-MS 測定後に吸入麻酔から開放した後は、マウスが実験前の活動状態に戻ることを確認した。



(a) PA-MS 装置外観



(b) 測定中の様子

図16 in vivo マウス測定系

#### ・測定時間短縮化システム作成

マウスへの負担を軽減するために測定時間の短縮化を行った。NI 社製の PXI-5154 を用いて、データ転送にかかる時間を大幅に短縮した。ブロックダイアグラムを図17に示す。

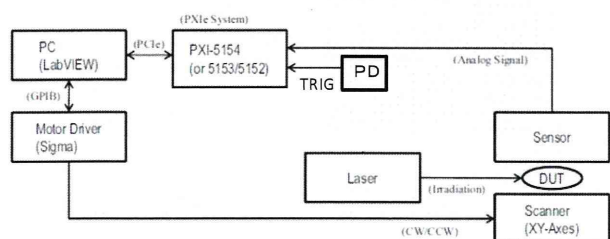


図17 データ取得のブロックダイアグラム

これにより試作当初の約4分の1の測定時間で画像取得が可能となった。例えば 10mm 角の領域を取得する場合、従来 60 分かかっていたものが本検討によって 16 分で取得できるようになった。現在その測定時間の律速となっているのは、光音響信号を励起するためのレーザーの繰り返し周波数である。

現在のところ10Hz の繰り返し周波数を有するレーザーを使用しているが、今後は高繰り返し周波数のレーザー (DPSS レーザー等) を用いて更なる測定時間の短縮化を行う計画である。

#### [2] 担癌マウス in vivo 測定

吸入麻酔下にて生きた状態における担がんマウスを測定した。測定に用いたマウスは、ヌードマウス (BALB/cAJcl-nu) であり、ヒト乳腺癌 (MDA-MB231 株) を左足の付け根に担がんさせ腫瘍を成長させた。腫瘍径が約 5mm になった時点でSPF環境下から取り出し、48時間以内に光音響顕微鏡を用いた腫瘍部の血管の測定を行った。

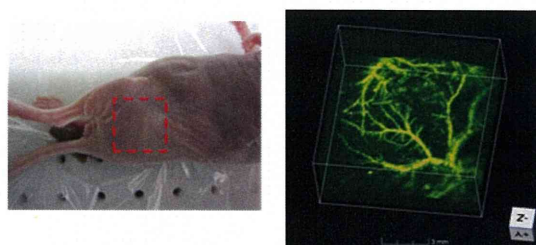


図18 測定結果例 (左:データ取得範囲、右:撮影結果)

本実験で用いたレーザーの測定波長は 532nm、サンプリングレートは 500MHz、X 方向と Y 方向の走査は共に 0.1mm ピッチで 101 ステップの走査を行った。測定時間は約 16 分であった。

図18左の写真内の点線部を画像化し3D 表示したものが図18の右図である。腫瘍まわりの血管がイメージングされている結果が得られた。

・腫瘍有無による血管密度の比較

同一マウスにおける腫瘍部位(左足)と担癌していない部位(右足)の PA-MS 像を測定し比較した。本検討では、ヒト表皮がん A431 株を担癌したマウスを測定した。本測定は X 方向と Y 方向の走査は共に 0.05mmピッチで 101 ステップの走査を行った。結果を図19に示す。

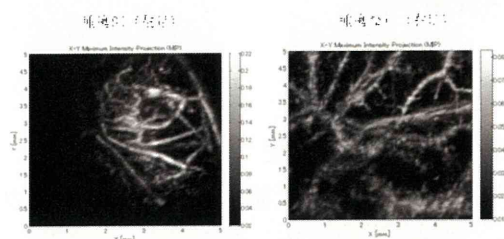


図19 腫瘍有無の比較  
(左:腫瘍あり、右:腫瘍なし)

この結果、健常側(右足)よりも腫瘍側(左足)の血管密度の方が高い様子が観察された。

・腫瘍細胞株による血管密度の比較

次いで様々ながんの細胞株を培養し、担がんさせた腫瘍を測定した。今回は、ヒト類表皮癌 A431、ヒト結腸腺癌 LS180、ヒト繊維肉腫 HT1080、ヒト乳癌 MDA-MB231 を用いた。結果を図20に示す。

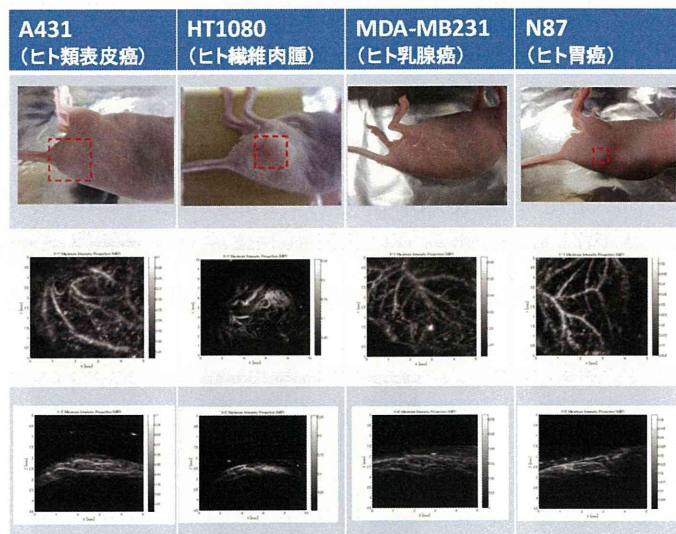


図20 さまざまな株の担がんマウス

現在のところ、血管の量や形態に若干の差異が見られるが、現段階ではまだ多くのマウスを用いた実験を実施できていないため、単なるマウスの個体差なのか株の差が現れているのかは明らかではない。今後は実験数を増やして傾向を解析する予定である。

また、乳がん系の細胞株についても今後検討を進める予定である。

[3] 光音響画像と免疫染色画像との比較

ヒト表皮がん A431 株を担癌したマウスを PA-MS にて測定し、その結果と免疫染色の結果との比較を行った。

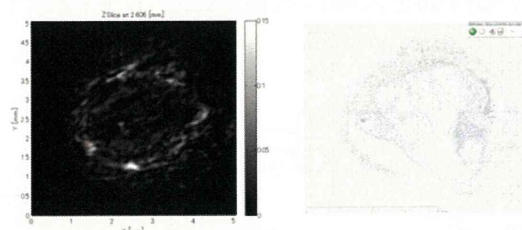


図21 PA-MS 像と免疫染色画像との比較 (左: PA-MS の断面像、右:腫瘍断面の CD31 染色画像)

この3D 画像を走査面(XY 面)でスライスして表示したものが図21左図である。腫瘍周囲の強度が強いことが分かる。

PA-MS 測定後に腫瘍を摘出してスライスしたものを Zinc 固定液で固定した後パラフィンブロックとし、スライドを作成し CD31 により染色した。図21右図は染色後の顕微鏡画像であり、腫瘍周囲が多く染色されている。これらの結果より、腫瘍周囲に血管が多く内部には少ないという免疫染色の結果を PA-MS 画像で再現できることが分かり、PA-MS 画像の妥当性が示された。

#### [4] 血液の酸素飽和度測定

PA-MS において血液の酸素飽和度のイメージングを行うにあたり、値の妥当性を検証した。実験の流れを図22に示す。

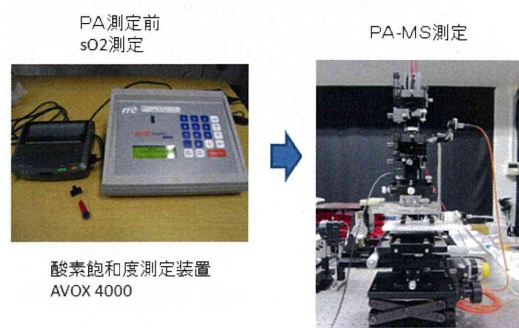


図22 酸素飽和度値の妥当性検討の流れ

PA-MS 測定前に市販で実用化されている酸素飽和度測定器(AVOX 4000)を用いて酸素飽和度を計測した。その後、PA-MS 測定を行い、測定後に再度 AVOX 4000 による計測を行った。PA-MS 測定中の酸素飽和度はこの測定前と測定後の値の間に入るようになる。

血液は図23に示すキュベットにいれて PA-MS、AVOX 共に同一サンプルで測定した。

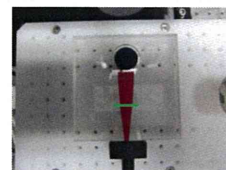


図23 使用したキュベット

PA-MS は図23の緑の実線上を走査しながら測定した。0.1mm ピッチで 121 ステップの走査を行った。測定波長は 756nm と 797nm の 2 波長を用い、この波長のデータから酸素飽和度を算出した。

サンプルは4つ酸素飽和度の異なるものを作製した。血液の酸素化は酸素置換し、脱酸素化は二酸化炭素で置換することにより行った。それぞれの、サンプルの AVOX での値を表1に示す。測定前と測定後の値はほとんど変化がなかった。

表1 酸素飽和度の経時変化

酸素飽和度値@ Avox		
Sample	測定前	測定後
1	95.5 %	95.5 %
2	77.1 %	76.6 %
3	61.3 %	61.7 %
4	11.4 %	12.3 %

図24は、各サンプルの PA-MS による実線上の酸素飽和度値をヒストグラム表示したものである。各サンプルにおけるピーク値は AVOX による値とほぼ一致している結果が得られた。

この結果により PA-MS により酸素飽和度のイメージング画像が定量的に解釈可能であることが分かった。



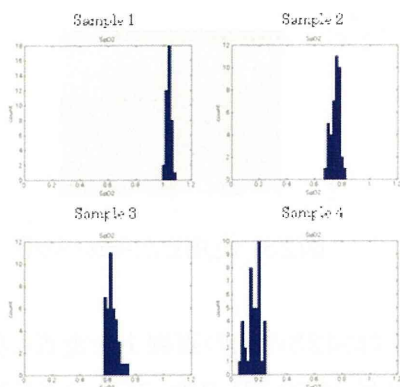


図24 PA-MS による酸素飽和度値のヒストグラム

次にタイゴンチューブ内に酸素化血(左、AVOX 値 97%)と脱酸素化血(右、AVOX 値 20%)を入れた血管ファントムを作製して PA-MS 測定を測定した。図25に血管ファントムの写真を示す。

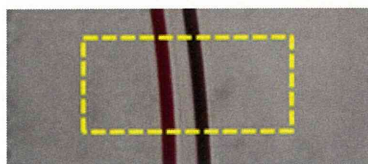


図25 血管ファントム

図26は PA-MS による酸素飽和度イメージングの結果である。酸素飽和度の大小が良好にイメージングされている結果が得られた。数値データを比較検討した結果、今回の血管ファントムで得られた脱酸素化血の酸素飽和度の値が、概ね30%程度であり、AVOXによって測定された値より約10%高かった、これはチューブに血液を封入する際に、大気に触れ酸素化されてしまったためであると考えられる。一方の酸化血に関しては、両者はほぼ同一の値を示していた。

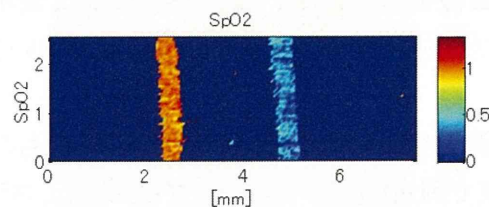


図26 血管ファントムの酸素飽和度測定結果

引き続き、上記の検討結果を元にして、in vivo マウスの酸素飽和度測定を行った。図27にマウス尾血管の酸素飽和度測定結果を示す。

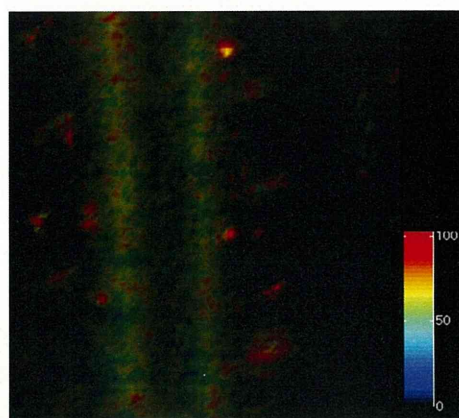


図27 マウス尾血管の酸素飽和度測定結果

このように生きたままのマウスの血液の酸素飽和度を画像化することができた。現在のところノイズの影響により、場所によって数値にばらつきが存在しているが、今後、SN比を改善することによって画質改善を図り、正しく定量データが得られるものと考えている。その上で本研究にて構築した実験系を用いて腫瘍の状態や性質と酸素飽和度との関係を測定し、医学的な知見を蓄積する予定である。

(FP方式)

本研究期間では University College London(UCL)の研究グループから報告されたFP方式(L.J. Zhang et al., Applied Optics, 48(10), 2009)を、広帯域プローブ

として実用化する際に生じる課題の抽出と、課題解決に向けた検討を行った。さらに、測定の高速度化を目的として従来報告されているガルバノミラーを用いた方式に加え、ビデオカメラを用いてプローブ受信部の二次元面内の音響圧力分布を一括でデータ取得する方式の検討を実施した。

本研究期間に検討した主な検討項目は次の通りである。

- [1] 従来のガルバノミラー方式
- [2] 高速二次元エアセンサ方式システム構築
- [3] 実用化に向けた課題
- [4] 今後の改善方針

[1] 従来のガルバノミラー方式

図28に一次試作に用いたガルバノミラー方式の装置構成図を示す。

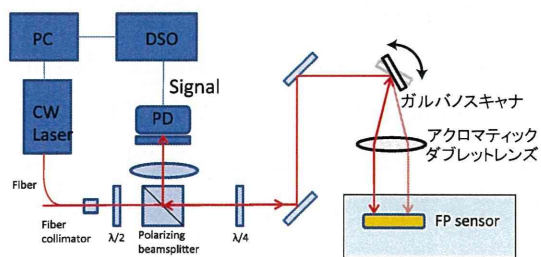


図28 FP方式の装置構成図

この装置を用いてデータを取得した。0.3mm のゴムワイヤーをファントムとして用い、画像取得した結果を図29に示す。

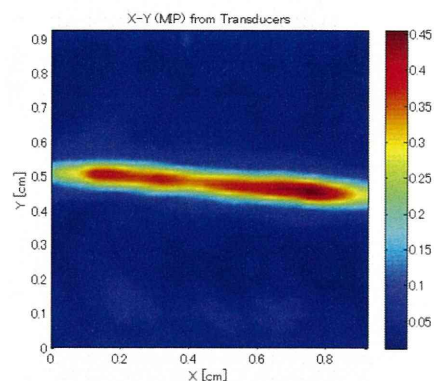
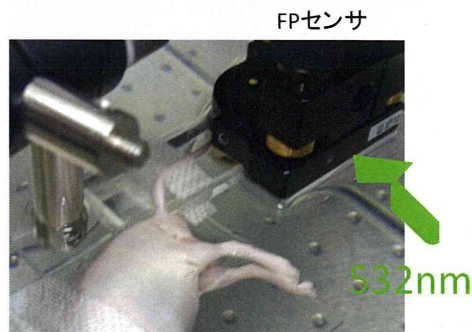


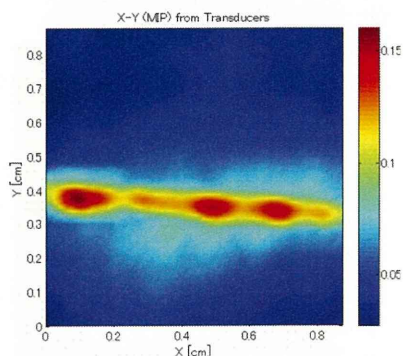
図29 FP方式で得られたファントム像

この結果より、FP センサーが正しく機能し、光音響像を取得できることが示された。一方、解像度に関しては、図29において半値幅が 0.75mm 程度となっており、改善に向けた課題が残されている。先行研究では良好な解像度を取得できているため、引き続き光学系の調整を含め、解像度劣化の原因を追求する予定である。

次いで、動物実験を行った。用いた波長は PA-MS 方式と同様に 532nm とし、サンプリングレートは100 MHz、スキャン点数は XY ともに51点、スキャンピッチは 0.174mm とした。結果を図24に示す。



(a) 動物実験の様子



(b) マウスの尾の FP-PAT 画像

図30 動物実験結果

上述したとおり解像度が不十分であるが、マウスの尻尾にある血管が画像化されており、生体の血管情報の画像化に適用可能であることが示された。

こうして画像を得ることができたが、本検討を通して測定時間が極めて長いことが明らかとなった。つまり、試作および評価によって、各測定箇所における光音響信号に対する感度が最も高くなるレーザー波長(以後、最適波長と呼ぶ)の探索処理が測定時間の主なボトルネックになることがわかった。そこで測定シーケンスを見直し、フォトダイオードの測定データのPCへの転送を各箇所の測定ごとに行うのではなく、すべての測定が終了した時点で行うことで、最適波長探索時間を約1/2に短縮することが可能になった。例えばこれにより51×51(4.35mm角)の測定点数で約20分に短縮させることができた。

ところが、この測定時間ではまだ実用には程遠いため、更なる改善を要する。具体的な対策としては、あらかじめ個々のセンサーの最適波長分布を探索しておき、実際に測定する際には探索波長領域をある程度絞った状態にしておくことや、現状では波長探索のための反射強度と光音響信号をともに同じオシロスコープで取得しているが、これを別の計測器で行うことで処理速度を上げることなどが想定された。

しかしながら、こうした検討を盛り込んだとしても臨床に適用できるほどの高速化が出来る見通しを得ること

ができなかった。そのため、ガルバノミラー方式による検討はここまでとし、二次元エアリセンサによる画像取得方式を検討することとした。

## [2] 高速二次元エアリセンサ方式システム構築

上記結果を受け、二次元エアリセンサを用いたFP方式の検討を開始した。エアリセンサ(CCD)を用いた検討はUCLの研究グループで超音波センサーとして論文として報告されている(Elec. Lett., 2006, Vol. 42, No. 3)ものの、単発の発表にとどまっておらず、光音響への応用事例など、その後の継続的な発表がない。

これが実現出来れば、FPセンサーによって受信された超音波信号の二次元面内の音圧分布を、エアリセンサを用いて一括でデータ取得することができるため、リアルタイムでの測定が実現可能になる。

そこでエアリセンサ方式による実験システムの立ち上げを行った。我々の検討に用いた二次元エアリセンサはPhantom V710(ノビテック社製)という高速CMOSエアリセンサであり、最短露光時間は300ナノ秒である。UCLではパルス光源を測定光としているが、本検討ではCW光源を測定光とし、CMOSエアリセンサの高速性を利用して音響波をイメージングしている点が異なっている。

図31にエアリセンサ方式による実験装置の構成図、図32にこの装置の外観を示す。

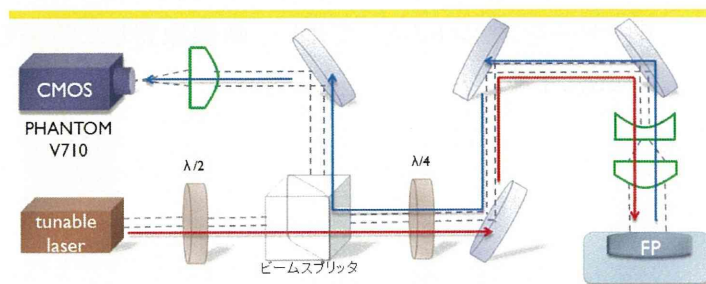


図31 エアリセンサ方式の構成図



図32 エリアセンサ方式の実験系の外観

また、この方式に用いるFPセンサーの特性評価を行った。図33に反射強度の波長依存性を示す。これによりFP特性に起因する反射率の落ち込みが観測されていることが確認された。

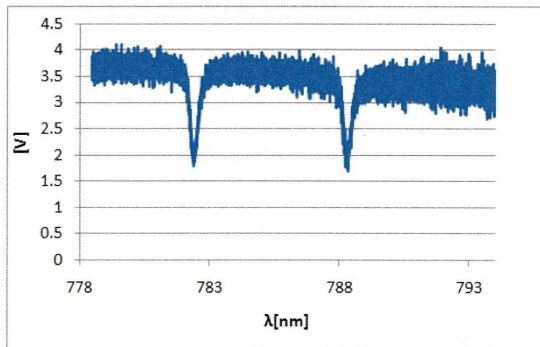
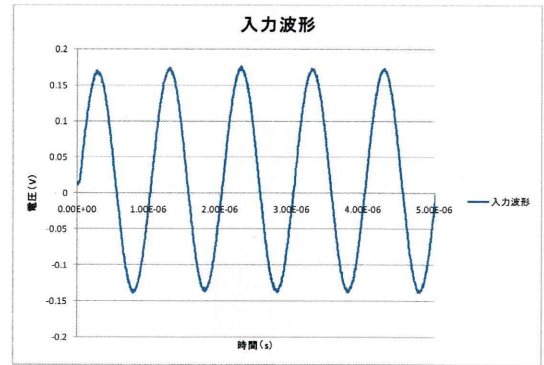
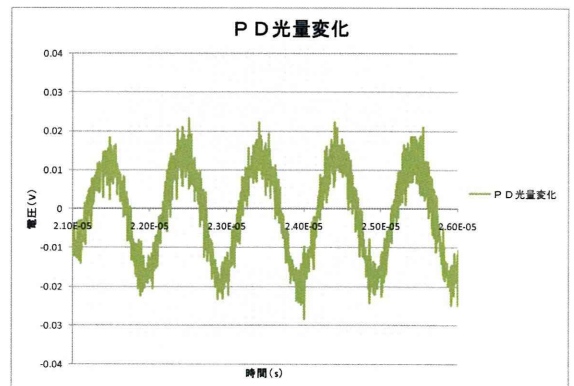


図33 FPセンサーの反射強度の波長依存性

次いで、本素子を用いた音圧検知について検討を行った。超音波の音源として1MHzの中心周波数を有するフォーカストランスデューサを用いて、FP膜に周波数1MHzの正弦波を印加して超音波を照射した。一方CWレーザーを測定光としてFP膜に光を照射し、フォトダイオードを使って反射率の変化を観察した。図34(a)がトランスデューサへの入力波形、(b)が反射率を測定した際のフォトダイオードの応答波形である。



(a) トランスデューサへの入力波形



(b) フォトダイオードの応答

図34 音圧印加による反射率応答

この結果より、入力波形と同じ周波数を有する正弦波状の光量変化が得られることが確認できた。

次いで、この素子でエリアセンサによる測定を行った。エリアセンサの露光時間を333nsとして正弦波の1周期を3分割した。それぞれのタイミングで露光し、得られた画像を記録した。超音波受信時に得られたそれぞれの画像について、無音状態で得られた画像との差分を計算した。結果を図35に示す。